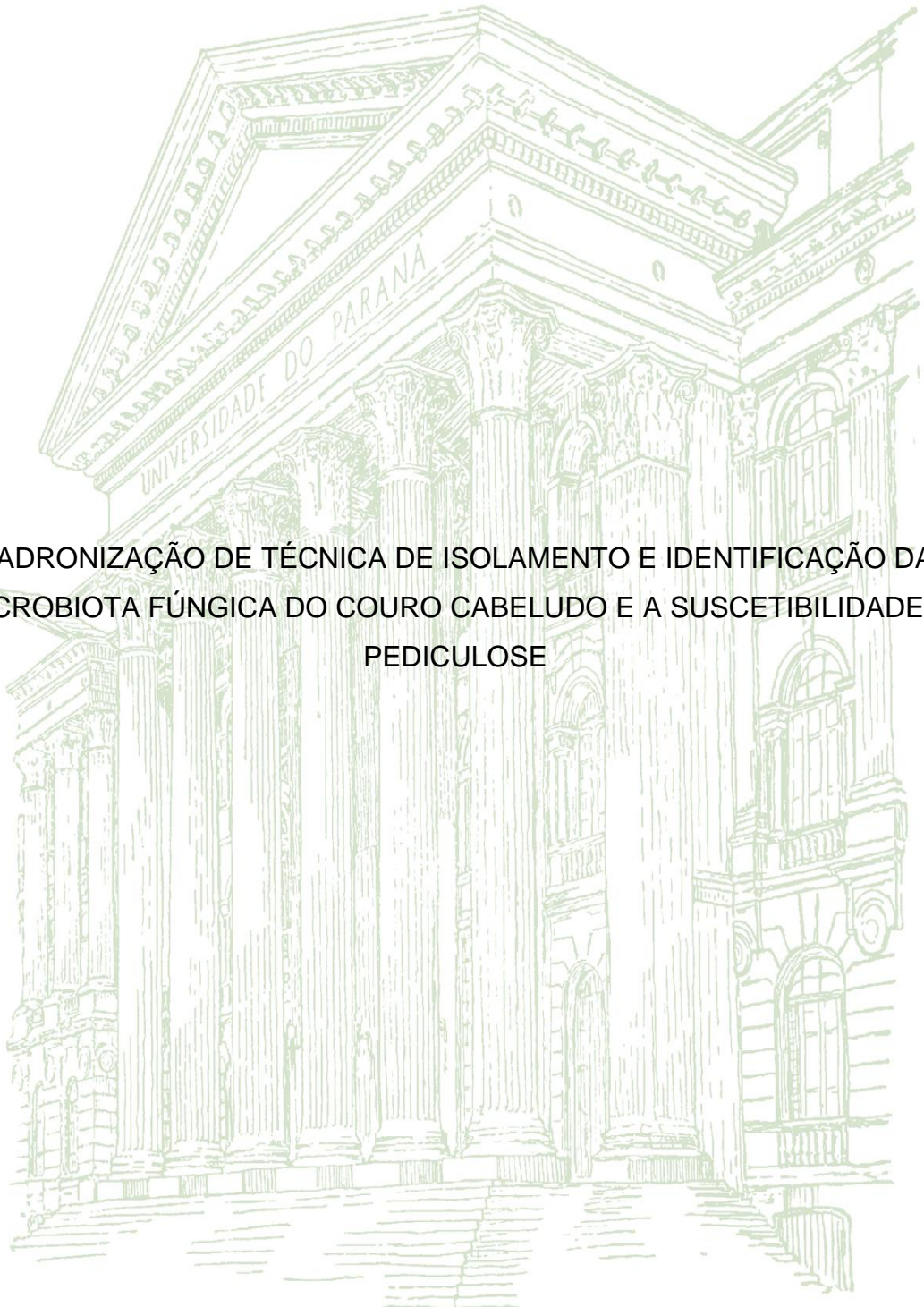


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA MENDES SOARES



PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA  
MICROBIOTA FÚNGICA DO COURO CABELUDO E A SUSCETIBILIDADE À  
PEDICULOSE

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA MENDES SOARES

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA  
MICROBIOTA FÚNGICA DO COURO CABELUDO E A SUSCETIBILIDADE À  
PEDICULOSE

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Biomedicina da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Débora do Rocio  
Klisiowicz

Coorientadora: Me. Juciliane Haidamak

CURITIBA

2015

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por me apontar o caminho certo, inclusive na minha escolha pela Biomedicina.

A meus pais Maria Aparecida e José, minha irmã Letícia e demais familiares pelo apoio e amor incondicionais.

Às minhas amigas Bruna Jacomel, Letícia Macohin, Ludiana Cardoso e Melyssa Kmecick pelo companheirismo e suporte ao longo do curso.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Débora Klisiowicz e Me. Juciliane Haidamak pelo empenho dedicado na elaboração deste trabalho.

Aos colegas do LabMicro pelas orientações e apoio na realização dos experimentos.

## RESUMO

A pediculose por *Pediculus humanus capitis* é uma parasitose que atinge inúmeras pessoas em todo o mundo, principalmente crianças em idade escolar. É de conhecimento popular que alguns indivíduos são mais suscetíveis à parasitose que outros, no entanto, fatores inerentes ao hospedeiro que influenciam na suscetibilidade não são bem esclarecidos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi a padronização de um protocolo completo para isolamento e identificação da microbiota fúngica do couro cabeludo. A coleta da microbiota do couro cabeludo foi realizada com swabs estéreis friccionados na cabeça de oito crianças e acondicionados nos meios de transporte Stuart e Sabouraud. O material coletado foi plaqueado para isolamento dos fungos em placas de petri com os meios Ágar Sabouraud (SBA) com tetraciclina e Ágar Batata Dextrose (BDA). Após o crescimento, as colônias morfológicamente diferentes foram purificadas em placas com meio BDA. Foi observado o crescimento de fungos filamentosos e leveduras. Colônias com aspecto leveduriformes tiveram sua morfologia confirmada em lâminas com coloração de Gram. O meio de transporte Stuart mostrou-se o mais viável em relação ao meio SBA; quanto ao crescimento micológico os dois meios foram semelhantes. Depois de purificados, foi realizado microcultivo dos fungos filamentosos para a identificação morfológica. A técnica não se mostrou eficiente, já que a maioria dos fungos não apresentou esporulação, tornando impossível a identificação por morfologia. Os fungos filamentosos e leveduras foram identificados através do sequenciamento da sequência nucleotídica da região ITS (Espaçador Transcrito Interno) do DNA ribossômico. Todas as técnicas testadas, com exceção do microcultivo, mostraram-se eficientes para o isolamento e identificação dos fungos do couro cabeludo. A partir desses dados, um protocolo completo para isolamento e identificação de fungos do couro cabeludo foi estabelecido. A padronização de técnica é um passo importante, já que a partir dela se definem protocolos corretos para as análises a serem realizadas posteriormente relacionadas a fatores de suscetibilidade à pediculose.

Palavras-chave: microbiota fúngica, couro cabeludo, pediculose, criança.

## ABSTRACT

The pediculosis by *Pediculus humanus capitis* is a parasitic disease that affects many people worldwide, mainly schoolchildren. It is popular knowledge that some individuals are more susceptible to parasites than others, however, factors inherent to the host that influence susceptibility are not fully understood. In this context, the objective of this study was to develop a complete protocol for isolation and identification of fungal flora of the scalp. Collection of the scalp microbiota was performed with sterile swabs rubbed on the head of eight children and stored in Sabouraud and Stuart transport medium. Collected material was spread to isolate the fungus in Petri dishes with Sabouraud agar (SBA) with tetracycline and Potato Dextrose Agar (PDA). After growth, the morphologically different colonies were purified in Petri dishes with PDA medium. Growth of filamentous fungi and yeasts was observed. Yeast-like colonies had their morphology confirmed by Gram staining. Stuart transport medium proved to be the most feasible in relation to SBA medium. The mycological growth was similar in both mediums. Once purified, the filamentous fungi microculture was performed for the morphological identification. The technique was not efficient because most fungi showed no sporulation, making the morphological identification impossible. Filamentous fungi and yeasts were identified by sequencing of the ITS region (Internal Transcribed Spacer) of the ribosomal DNA. All tested techniques, except microculture, were effective for the isolation and identification of the scalp fungus. From these data, a complete protocol for isolation and identification of the fungal microbiota in human scalps was established. The technical standardization is an important step because from it are defined correct protocols for future tests related to susceptibility factors to pediculosis.

Keywords: fungal microbiota, human scalp, pediculosis, children.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	8
2.1 Posição sistemática .....	8
2.2 Morfologia dos piolhos .....	9
2.3 Epidemiologia.....	9
2.4 Papel da microbiota da pele na atração a hematófagos .....	10
2.5 Compostos voláteis exalados pela microbiota da pele.....	11
2.6 Microbiota fúngica do couro cabeludo.....	11
2.7 Identificação de fungos .....	12
3. HIPÓTESE .....	13
4. JUSTIFICATIVA .....	13
5. OBJETIVOS .....	13
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
6.1 Público alvo.....	14
6.2 Coleta e isolamento da microbiota fúngica do couro cabeludo .....	14
6.3 Coloração de Gram das colônias de aspecto leveduriforme .....	15
6.4 Microcultivo de fungos filamentosos .....	15
6.5 Estoque dos fungos e leveduras .....	16
6.6 Extração do DNA fúngico .....	16
6.7 Amplificação da região ITS do DNA fúngico .....	17
6.8 Sequenciamento do DNA fúngico .....	18
6.9 Precipitação da reação com isopropanol e sequenciamento .....	19
6.10 Análise das sequências de DNA fúngico .....	19
7. RESULTADOS .....	20
7.1 Cultura de fungos do couro cabeludo .....	20
7.2 Microcultivo .....	21
7.3 Amplificação da região ITS do DNA fúngico .....	22
7.4 Sequenciamento do DNA fúngico .....	24
8. DISCUSSÃO .....	24
9. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
ANEXOS .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

A pediculose é uma doença muito comum na infância, que atinge principalmente crianças em idade escolar independentemente da idade, sexo ou condição socioeconômica. Esta parasitose é causada pelo *Pediculus humanus capitis*, mais conhecido como piolho, um ectoparasita que desenvolve o seu ciclo de vida no ser humano alimentando-se de sangue. Devido ao prurido provocado pela saliva do piolho durante a sua alimentação, frequentemente observam-se lesões no couro cabeludo que podem evoluir para quadros de infecções bacterianas, fúngicas e até mesmo miíases (ROBINSON *et al.*, 2003). Em casos de infestação grave as crianças podem desenvolver anemia devido à intensa atividade hematófaga dos piolhos (LINARDI, 2002).

A forma de transmissão do piolho se dá por contato direto de pessoa-pessoa ou por compartilhamento de objetos como bonés, chapéus, travesseiros, pentes ou prendedores de cabelo, que podem servir como fômites na transmissão do parasita (GULGUN *et al.*, 2013). Devido ao seu comportamento social as crianças são as mais afetadas pela parasitose, já que acabam por compartilhar objetos pessoais e ficam próximas umas das outras para brincar. A falta de participação dos pais ou responsáveis na inspeção visual da cabeça das crianças para a procura de piolhos também interfere na infestação por esses insetos (CATALA *et al.*, 2005).

Apesar da pediculose ser tão antiga quanto a humanidade (WEISS, 2009), ainda há poucos estudos sobre a prevalência da doença no Brasil (MADUREIRA, 1992) e não há estudos registrados para a região metropolitana de Curitiba. A infestação por piolhos é um problema comum em creches e escolas de todo o Brasil e, apesar da alta prevalência, a falta de informações impede uma melhor compreensão sobre a pediculose; daí a necessidade de se estudar melhor as características da doença para uma promoção de vigilância e controle mais eficientes.

É de conhecimento popular que alguns indivíduos são mais suscetíveis à parasitose que outros. São comuns os relatos de indivíduos que nunca são acometidos pela doença, mesmo convivendo no mesmo ambiente e em mesmas condições de pessoas que têm infestações regularmente. Curiosamente, essa percepção ocorre não somente na infestação por *P. humanus capitis*, mas

também na atração diferenciada de outros hematófagos, como o *Anopheles gambiae* (vetor da Malária) e o *Aedes aegypti* (vetor da Dengue e Febre Amarela), por determinados indivíduos (SMALLEGANGE *et al.*, 2011).

É sabido que o mecanismo mais importante através do qual os mosquitos escolhem os indivíduos para a hematofagia são os odores exalados pelo hospedeiro (BOWEN, 1991). Comunidades microbianas da pele desempenham um papel-chave na produção de odores no corpo humano e estudos demonstram que a composição desta flora microbiana afeta o grau de atratividade do *A. gambiae* pelos seres humanos (VERHULST *et al.*, 2011, KNOLS *et al.*, 1995a, SMALLEGANGE *et al.*, 2011). Apesar de haver diversas publicações de trabalhos que associam a atratividade de mosquitos hematófagos por odores produzidos pela microbiota da pele, não há estudos deste âmbito relacionados à pediculose. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo para isolamento e identificação de fungos do couro cabeludo que será utilizado em estudos futuros a fim de verificar se a flora micológica do couro cabeludo tem influência na infestação por *P. humanus capitis* em escolares da rede pública da região metropolitana de Curitiba, comparando a população micológica isolada do couro cabeludo de crianças mais propensas à parasitose com a isolada de crianças que nunca foram parasitadas e aquelas que esporadicamente são infestadas.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Posição sistemática**

Os piolhos são artrópodes pertencentes à classe Insecta, ordem Phtiraptera, subordem Anoplura, família Pediculidae (DURDEN & MUSSER, 1994). Três espécies de piolhos, colocadas em 2 gêneros, são capazes de parasitar humanos: *P. humanus capitis* (piolho de cabeça), *Pediculus humanus corporis* (piolho do corpo) e *Pthirus pubis* (piolho da região pubiana) (BARBOSA & PINTO, 2003).

## 2.2 Morfologia dos piolhos

Os piolhos são insetos ápteros que possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. A cabeça é pequena, ovóide e distinta do tórax; apresenta um par de antenas constituído por cinco segmentos, um par de olhos simples e aparelho bucal do tipo picador-sugador. No tórax estão inseridos 3 pares de pernas, divididas em coxa, trocanter, fêmur, tíbia e tarso (garra tarsal). O abdome é constituído por nove segmentos, sendo os dois primeiros segmentos fundidos em um só. O último segmento nos machos é arredondado e nas fêmeas é bilobado (FIGURA 1). Os machos medem de 2,1 a 3,0 mm e as fêmeas de 2,4 a 3,6 mm de tamanho (LINARDI; MARCONDES, 2001).

Os ovos, também conhecidos como lêndeas, apresentam coloração esbranquiçada e formato elíptico e medem aproximadamente 0,8 mm de comprimento por 0,5 mm de diâmetro. Estes ovos são depositados pela fêmea a cerca de um centímetro do couro cabeludo e ficam fortemente aderidos aos fios de cabelo devido a uma substância proteica secretada pelas glândulas acessórias presentes no oviduto (BURKHART *et al.*, 1999).

O *P. humanus capitis* possui desenvolvimento hemimetábolo, passando pelas fases de ovo, ninfa (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> estágio) e adulto (macho e fêmea). Todas as fases ninfais, machos e fêmeas são hematófagos. Os ovos levam de 6 a 9 dias para eclodir e as ninfas demoram de 9 a 15 dias para tornarem-se piolhos adultos. O tempo de vida dessa espécie é de 3 a 4 semanas (TEBRUEGGE *et al.*, 2011).

## 2.3 Epidemiologia

Sabe-se que a pediculose é um problema de saúde pública, pois inúmeras pessoas são afetadas em todo o mundo, independentemente de fatores socioeconômicos ou de higiene, sendo a prevalência maior em crianças na faixa etária dos 3 aos 11 anos (CHOSIDOW, 2000).

Estudos indicam que alguns fatores podem ser relevantes para o contágio, como por exemplo, o comprimento do cabelo. É conhecido que o gênero feminino tem uma maior suscetibilidade à pediculose do que o gênero

masculino. Sugere-se que meninas são mais afetadas pela parasitose devido ao cabelo longo, que dificulta a aplicação de medidas de controle, e ao comportamento social que apresentam, pois ficam fisicamente mais próximas umas das outras. Também pode-se verificar que o número de crianças afetadas varia conforme o período do ano letivo, sendo que no período de férias há diminuição na infestação. Brincadeiras de aproximação e contato interpessoal, juntamente com a socialização de acessórios de cabeça e cabelos, diminuem no período de férias escolares, o que pode justificar a diminuição nas taxas de infestação nesse período (CATALA *et al.*, 2004; MUMCUOGLU *et al.*, 2001).

## **2.4 Papel da microbiota da pele na atração a hematófagos**

A localização do hospedeiro por fêmeas de mosquitos hematófagos é mediada por indícios físicos e químicos derivados deste, sendo que o principal deles são os odores exalados pela pele (TAKKEN & KNOLS, 1999). A microbiota da pele desempenha um importante papel na produção de odores em humanos, já que converte compostos não-voláteis em compostos voláteis com características odoríferas. O odor corporal emanado por cada indivíduo é correlacionado com a presença de micro-organismos específicos (RENNIE *et al.*, 1991).

Diversos estudos realizados com *Anopheles gambiae* mostram a importância da microbiota da pele na seleção de hospedeiros para a hematofagia. Braks & Taken, em 1999, mostraram que o suor humano é mais atrativo para o *A. gambiae* após ser incubado por um ou dois dias com bactérias da pele. Lavar os pés com sabonete bactericida também altera significativamente a seleção de locais para a picada (KNOLS & MEIJERINK, 1997). Um estudo realizado com 48 voluntários relaciona atratividade por *A. gambiae* com a microbiota da pele: indivíduos foram classificados como fortemente atrativos e pobremente atrativos. Bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Leptotrichia* e *Delftia* foram encontradas em maior abundância no grupo fortemente atrativo, enquanto os gêneros *Pseudomonas* e *Variovorax* foram relacionados ao grupo pobremente atrativo. Além disso, foi mostrado que compostos voláteis emanados por *Staphylococcus epidermidis* são atrativos

para *Anopheles gambiae* fêmeas, enquanto que os compostos exalados por *Pseudomonas aeruginosa* as repelem (VERHULSTI *et al.*, 2011). Quanto aos fungos, sugere-se que os ácidos graxos na pele, produtos da degradação de triglicerídeos por *Malassezia* (fungo residente das glândulas sebáceas), alteram a atividade metabólica de outros micro-organismos da flora, que varia entre os seres humanos, o que pode também explicar a atratividade diferencial para o *A. gambiae* (KNOLS, 1996; KNOLS *et al.*, 1995).

## 2.5 Compostos voláteis exalados pela microbiota da pele

Diversos compostos voláteis exalados da microbiota da pele que influenciam o comportamento de busca dos insetos hematófagos por hospedeiros já foram identificados. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por exemplo, desempenha um papel importante para atração dos mosquitos por indivíduos em distâncias mais longas (TAKKEN, 1991). Amônia, ácido láctico e ácidos carboxílicos estão envolvidos com a atração destes insetos por humanos (MBOERA, 2000).

O ácido láctico combinado com CO<sub>2</sub> tem sido relatado como atrativo para o *Aedes aegypti* (ACCRE *et al.*, 1968), enquanto uma mistura de amônia, ácido láctico e ácido tetradecanoico é efetiva na atração de *Anopheles gambiae* (VERHULST *et al.*, 2010). Não há na literatura relatos de compostos odoríficos identificados como atrativos para *P. humanus capitis*.

## 2.6 Microbiota fúngica do couro cabeludo

O couro cabeludo humano abriga uma vasta comunidade de microrganismos mutualistas. Em indivíduos saudáveis, predominam no couro cabeludo fungos dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Dentre os ascomicetos, aparecem as espécies *Acremonium spp.* (72%) e *Didymella bryoniae* (23%), havendo também uma pequena porcentagem de *Candida spp.* (2%). Dentre os basidiomicetos, fungos do gênero *Cryptococcus* aparecem em grande quantidade (89%), sendo também encontrados fungos do gênero *Rhodotorula*

(6%), dentre outros (PARK *et al.*, 2012). Em algumas doenças, como é o caso da dermatite seborreica, pode haver alteração na composição da microbiota fúngica.

## 2.7 Identificação de fungos

Os métodos usuais de identificação de fungos filamentosos são baseados em critérios morfológicos, onde a observação das características das estruturas de reprodução, juntamente com a utilização de chaves de identificação, pode proporcionar uma rápida caracterização (LUPATINI *et al.*, 2008). No entanto, alguns fungos filamentosos não esporulam, tornando impossível a identificação. A caracterização da maioria das leveduras também não é viável utilizando-se apenas de observação morfológica. Assim, o diagnóstico molecular apresenta-se como a forma mais confiável de identificação de espécies.

As técnicas de diagnóstico molecular conhecidas baseiam-se na análise da sequência dos ácidos nucleicos para a identificação das espécies (MARQUES *et al.*, 2002). A técnica mais utilizada para a identificação de fungos é a amplificação do DNA ribossômico (rDNA) por reação em cadeia da polimerase (PCR). A região do rDNA dos eucariotos consiste de repetições de regiões codificadas 18S, 5,8S e 28S separadas por sequências espaçadoras internas codificadas ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*) e uma sequência espaçadora externa ETS (*external transcribed spacer*) localizada no início do gene 18S. Cada repetição é separada por uma região espaçadora não transcrita (NTS) (FIGURA 01). Os espaçadores ITS são altamente conservados intraespecificamente, mas são variáveis entre diferentes espécies, sendo largamente utilizados por serem bons indicadores taxonômicos (HILLIS & DIXON, 1991)

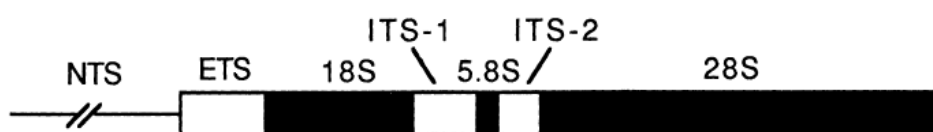


FIGURA 1 - ARRANJO DO rDNA EM EUCARIOTOS  
FONTE: adaptado de HILLIS & DIXON (1991)

### **3. HIPÓTESE**

Assim como a microbiota da pele tem um papel importante na atração diferencial a mosquitos hematófagos, acredita-se que a microbiota do couro cabeludo seja um dos fatores envolvidos na suscetibilidade diferencial à infestação por *P. humanus capitis*. Nesse contexto, foi estabelecido um protocolo para identificação da microbiota fúngica do couro cabeludo, que será utilizado em estudos futuros a fim de esclarecer se a microbiota fúngica do couro cabeludo e os odores que esses micro-organismos liberam influenciam na suscetibilidade à pediculose.

### **4. JUSTIFICATIVA**

A pediculose, apesar de ser um problema de saúde pública a nível mundial, não é amplamente estudada. Existem vários pontos sobre essa parasitose que ainda precisam ser esclarecidos, e um deles é a razão pela qual alguns indivíduos são mais acometidos pela infestação por piolhos que outros. Não há na literatura estudos comparando a microbiota do couro cabeludo de indivíduos saudáveis com a de indivíduos acometidos pela pediculose. Estudos deste tipo são importantes, pois podem revelar se há alguma mudança na microbiota do couro cabeludo quando da infestação por piolhos e quais fungos podem estar envolvidos no aumento da suscetibilidade a este parasita. Com um maior conhecimento sobre as características da doença e os fatores que a modulam é possível a realização de uma vigilância e controle mais eficientes, voltados para os indivíduos mais suscetíveis.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo geral**

Padronizar uma técnica de isolamento e identificação da microbiota fúngica do couro cabeludo para relacionar com a predisposição à pediculose.

## 5.2 Objetivos específicos

- Isolar os fungos residentes do couro cabeludo de crianças.
- Identificar, a nível de gênero, através de características morfológicas e sequenciamento os fungos e leveduras da microbiota normal do couro cabeludo.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Público alvo

O estudo foi realizado com 08 crianças com idades entre 6 e 11 anos, residentes na cidade de Curitiba/PR, cujos pais são professores, alunos de um programa de pós-graduação ou prestadores de serviço da Universidade Federal do Paraná. A suscetibilidade à parasitose foi estabelecida a partir do preenchimento de um questionário (ANEXO 01) com perguntas relacionadas à pediculose, que foi distribuído aos pais das crianças. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa CEP/SD – UFPR com o número 38757614.9.0000.0102.

### 6.2 Coleta e isolamento da microbiota fúngica do couro cabeludo

Para a análise da microbiota do couro cabeludo, foram excluídos os voluntários com doenças dermatológicas crônicas e que utilizaram antibióticos e/ou antifúngicos seis meses antes da amostragem. Os voluntários também foram instruídos a não utilizarem xampus, condicionadores ou creme de pentear 24 horas antes da amostragem.

Para cultura dos fungos foram realizados esfregaços no couro cabeludo das oito crianças com *swabs* estéreis, em uma área de aproximadamente 4cm<sup>2</sup>, na região occipital e retroauricular da cabeça. A coleta foi realizada em domicílio pelos próprios pais das crianças. Os *swabs* utilizados para coleta foram acondicionados em meios de transporte Stuart e Sabouraud líquido e

posteriormente plaqueados para isolamento dos microorganismos em placas de petri com os meios de cultura Ágar Sabouraud (SBA) (ANEXO 2) com tetraciclina 0,4 mg/L enriquecido com óleo de oliva e Ágar Batata Dextrose (BDA) (ANEXO 2). As placas foram colocadas em estufa a 28°C e o crescimento dos fungos foi acompanhado por até 15 dias. Após crescimento na placa, as colônias morfológicamente diferentes foram purificadas por estriamento em placas de petri com meio de cultura BDA e novamente colocadas em estufa a 28° C para crescimento.

### **6.3 Coloração de Gram das colônias de aspecto leveduriforme**

Para confirmação da morfologia dos fungos cujas colônias purificadas apresentaram aspecto leveduriforme, foram feitas lâminas coradas com Gram. Uma colônia foi colocada sobre uma lâmina de vidro e dispersa em uma gota de água destilada. A lâmina foi deixada próximo à chama do Bico de Bunsen para fixação do material até secagem completa da água e então foi feita a coloração de Gram (ANEXO 3). As lâminas foram secas em temperatura ambiente para posterior leitura ao microscópio óptico.

### **6.4 Microcultivo de fungos filamentosos**

Após o crescimento dos fungos filamentosos purificados por, em média, 4 dias, foi realizado o microcultivo para identificação morfológica dos mesmos. Em uma placa de petri de vidro foram colocados dois cubos de meio de cultura de tamanho 2cm x 2cm sobre uma lâmina de microscopia e um chumaço de algodão estéril embebido em 1ml de água destilada estéril. Os meios de cultura utilizados para o microcultivo foram SBA e BDA para cada fungo. Os fungos foram então semeados nos cantos do cubo de ágar, cobertos com uma lamínula estéril e colocados em estufa a 28°C. As lamínulas com as hifas e esporos aderidos foram retiradas após 7 e 14 dias de cultivo e colocadas sobre uma lâmina com uma gota de azul de algodão para visualização ao microscópio.

## **6.5 Estoque dos fungos e leveduras**

Os fungos filamentosos purificados foram estocados em tubos de ensaio com os meios sólidos Sabouraud e Extrato de Malte (ANEXO 2). Os fungos foram repicados na superfície dos meios de cultura e colocados para crescer em estufa a 28°C por aproximadamente 5 dias. Após o crescimento, os tubos foram acondicionados em temperatura ambiente.

As leveduras purificadas foram estocadas em tubos contendo Ágar Sabouraud. As leveduras foram semeadas na superfície do meio de cultura e colocadas em estufa a 28°C por aproximadamente 5 dias. Após o crescimento, foi acrescentado no tubo óleo mineral esterilizado até cobrir todo o meio de cultura, o que limita a quantidade de oxigênio disponível, causando assim uma redução no metabolismo das leveduras (RHODES, 1957). Os estoques foram mantidos em temperatura ambiente.

## **6.6 Extração do DNA fúngico**

Para a extração do DNA, os fungos filamentosos e as leveduras do estoque foram plaqueados em placas de petri com meio de cultura BDA e acondicionados em estufa a 28°C para o crescimento por, em média, 5 dias. Após o crescimento, aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> do micélio dos fungos filamentosos e a mesma quantidade de colônias de leveduras foram transferidos para um tubo eppendorf autoclavado contendo 80 gramas sílica-celite na proporção 2:1 e 300 µL de CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio), um detergente catiônico que em soluções de alta força iônica forma complexos com proteínas, mas não precipita os ácidos nucleicos. O micélio e as leveduras foram então macerados manualmente com maceradores de vidro autoclavados por aproximadamente 5 minutos para haver lise das células e extravasamento do DNA para a solução. Após macerados os fungos, foram adicionados mais 200 µL de CTAB em cada eppendorf e incubados em banho-maria a 65° por 10 minutos. Foram então adicionados em cada tubo eppendorf 500 µL de clorofórmio, que é utilizado para remoção das proteínas, e os mesmos foram centrifugados por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf com auxílio de

micropipeta de 200 µL. Foram repetidas as etapas de adição de clorofórmio, centrifugação e transferência do sobrenadante para novos tubos eppendorf. Foram então adicionados 800 µL de etanol 96% gelado e os tubos eppendorfs foram deixados *overnight* no freezer a -20°C para a precipitação do DNA. No dia seguinte os tubos foram retirados do freezer e centrifugados por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante (etanol) foi descartado após a centrifugação e o pellet de DNA foi então lavado com etanol 70% e novamente os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi retirado e os tubos foram deixados abertos em estufa por 30 minutos para haver a secagem do DNA. Após secagem completa, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de água Mili-Q autoclavada. Os tubos eppendorf com DNA purificado foram então armazenados em freezer a -20° C. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## 6.7 Amplificação da região ITS do DNA fúngico

Para a amplificação do rDNA fúngico foi realizada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') e V9D (5'-TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA-3') que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (VAN DEN ENDE & DE HOOG, 1999).

Para cada reação de amplificação, com volume final 25 µL, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Água Mili-Q 15,9 µL
- Tampão 2,5 µL
- Cloreto de Magnésio 1,5 µL
- dNTPs 2 µL
- *Primer* LS266 0,5 µL
- *Primer* V9D 0,5 µL
- Taq Polimerase 0,1 µL
- DNA 2 µL

A reação de PCR foi obtida em termociclador Biocycler MG96+, sob as seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 1 minuto. Os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.2% a 90 mV e 400 mA em TBE 1x. Após a corrida, foi feita a visualização das bandas com GelRed em transiluminador UV. Os produtos da PCR foram então purificados com 25 µL de PEG (polietilenoglicol) 20% e incubados em termociclador Biocycler MG96+, a 37°C por 30 minutos para promover a precipitação do DNA. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm por 30 minutos, tiveram o sobrenanante descartado e foram adicionados 62,5 µL de Etanol 80% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas a 1300 rpm por 2 minutos e lavadas com 62,5 µL de etanol 96%, que foi totalmente retirado. As amostras ficaram por 40 minutos em estufa para secagem total do etanol e então o DNA foi ressuscitado em 15 µL de água Mili-Q autoclavada e armazenado em freezer a -20°C.

## 6.8 Sequenciamento do DNA fúngico

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a região ITS do DNA ribossômico (FIGURA 02) (WHITE *et al.*, 1990). A reação de sequenciamento, com volume final 10 µL, para cada amostra de DNA foi realizada utilizando-se:

- Água Mili-Q 4,55 µL
- Buffer 5x (Applied Biosystems) 3 µL
- Big Dye (Applied Biosystems) 0,75 µL
- *Primer* ITS1 ou *primer* ITS4 0,7 µL
- DNA (produto da PCR purificado) 1 µL

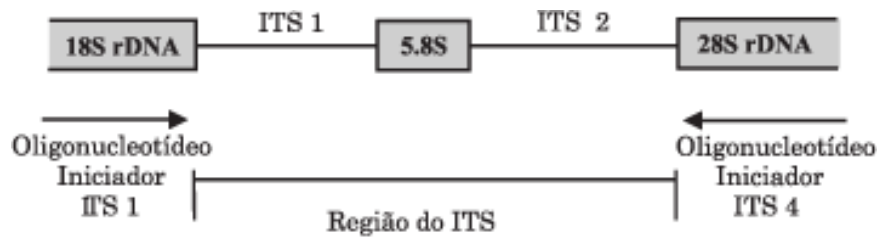


FIGURA 2 - REGIÃO ITS DO rDNA E AS REGIÕES DE LIGAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ITS1 E ITS4  
 FONTE: LUPATINI *et al.* (2008)

A reação de sequenciamento foi obtida em termociclador Biocycler MG96+ sob as seguintes condições: 96°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 15 segundos e 62°C por 4 minutos.

### 6.9 Precipitação da reação com isopropanol e sequenciamento

A precipitação do DNA foi realizada adicionando-se 40  $\mu$ L de isopropanol 75% gelado, que foi deixado por 20 minutos em temperatura ambiente em contato com as amostras e depois centrifugado por 30 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação o isopropanol foi removido dos tubos com auxílio de micropipeta e foram adicionados 200  $\mu$ L de etanol 70% não gelado em cada tubo. As amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação o etanol foi retirado com auxílio de micropipeta e as amostras foram secas em estufa a 60 °C por, aproximadamente, 30 minutos para posterior sequenciamento em sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), que foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

### 6.10 Análise das seqüências de DNA fúngico

As seqüências foram analisadas e corrigidas através dos programas STADEN Package (STADEN *et al.*, 2001) e BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999) e alinhadas com a versão 1.8 do CLUSTAL-W (THOMPSON *et al.*, 1994) e MEGA 3

(TAMURA *et al.*, 2004). Para a obtenção da composição nucleotídica e aminoacídica foi utilizado o programa MEGA 3 (TAMURA *et al.*, 2004). As sequências obtidas foram comparadas com sequências já caracterizadas existentes no banco de dados mantido pelo NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Cultura de fungos do couro cabeludo**

Foi observado o crescimento de 42 colônias em ambos os meios (SBA com tetraciclina e BDA), sendo 81% (34) colônias de aspecto leveduriforme e 19% (08) colônias de fungos filamentosos apresentando diversas morfologias, incluindo, por exemplo, colônias brancas algodonosas, brancas raiadas, verso branco e reverso amarronzado (FIGURA 03), sendo a maioria (62,5%) isolada do meio SBA com tetraciclina. A leitura das lâminas de Gram ao microscópio óptico de luz branca (Centauro), em objetiva de imersão (aumento de 1000x) revelou que, das colônias com aspecto leveduriforme, apenas 19,3% (08) apresentaram morfologia de leveduras, sendo o restante (80,7%) colônias de bactérias, principalmente cocos gram positivos. As colônias de bactérias foram direcionadas para futuros estudos referente à microbiota bacteriana do couro cabeludo, restando finalmente 16 colônias (08 fungos filamentosos e 08 leveduras).

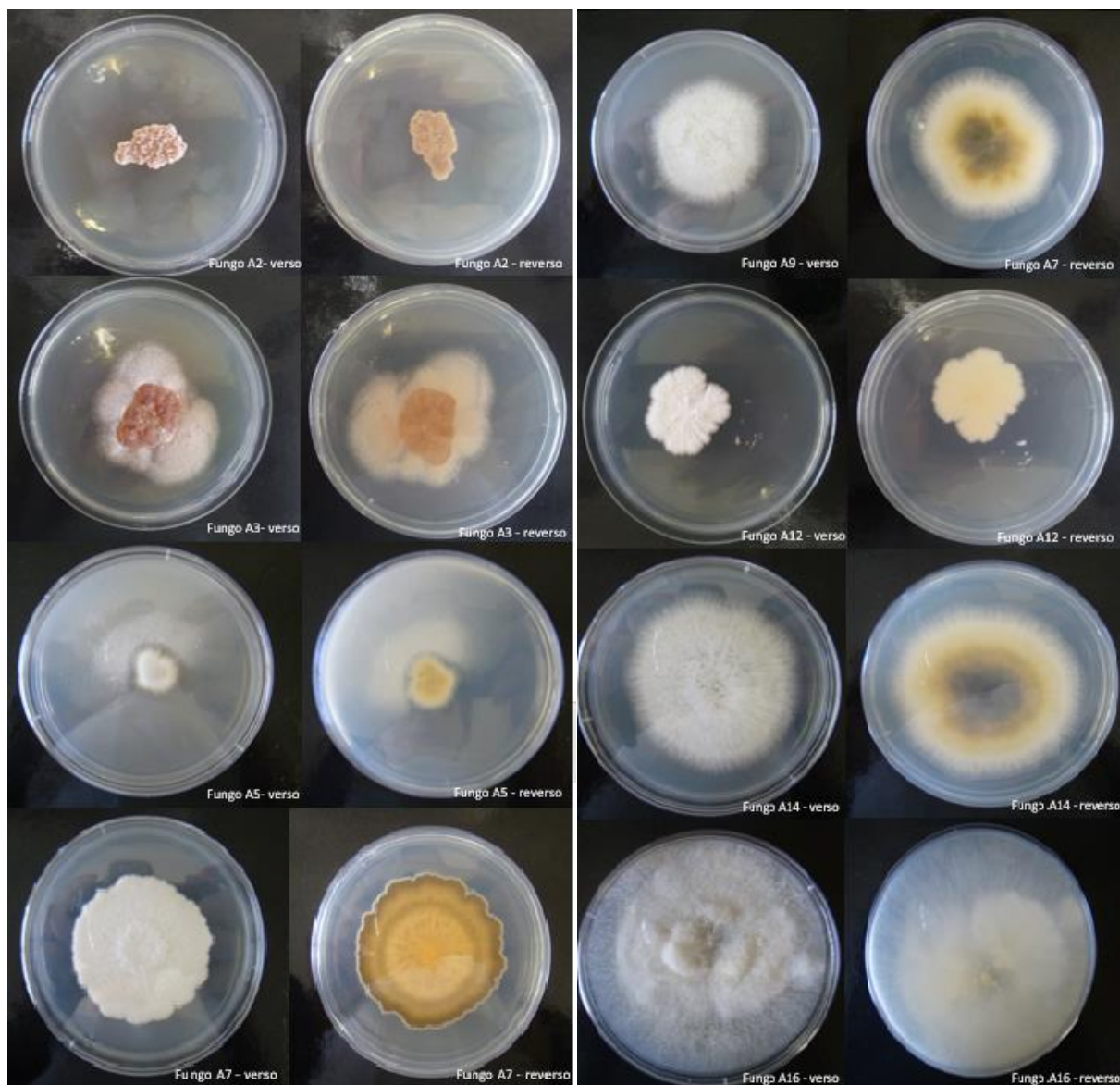


FIGURA 3 - CRESCIMENTO RADIAL EM MEIO BDA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS  
 FONTE: O autor (2015)

## 7.2 Microcultivo

Todos os fungos filamentosos do estoque submetidos ao microcultivo apresentaram crescimento com ausência de esporulação, tanto aos 07 quanto aos 14 dias, tornando assim impossível a identificação por morfologia. Alguns fungos apresentaram formação de estruturas diferenciadas, mas que não foram suficientes para caracterizá-los (FIGURA 4).

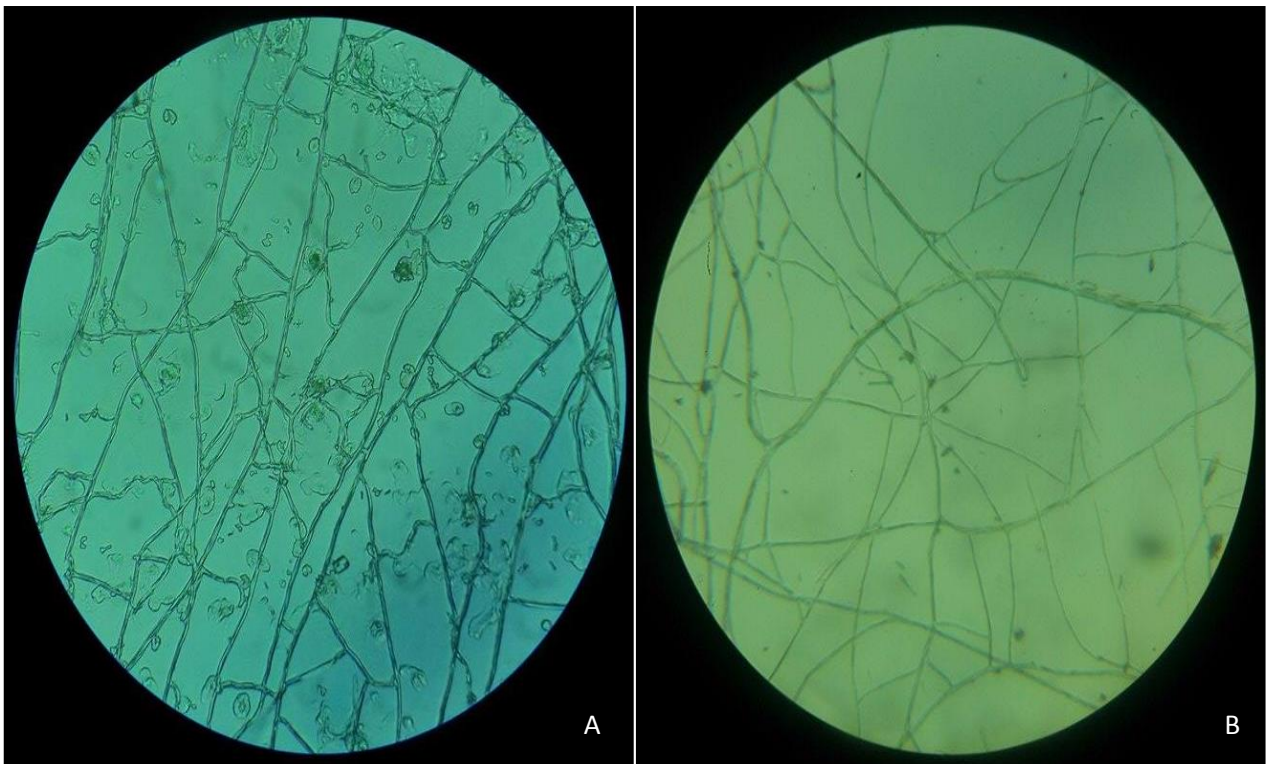


FIGURA 4 - LÂMINAS DE MICROCULTIVO VISTAS AO MICROSCÓPIO ÓPTICO EM AUMENTO DE 40x A: Lâmina de 14 dias de microcultivo apresentando hifas e estruturas diferenciadas, porém sem possibilidade de identificação por morfologia. B: Lâmina de sete dias de microcultivo apresentando somente hifas, também não sendo possível a identificação.

FONTE: O autor (2015)

### 7.3 Amplificação da região ITS do DNA fúngico

As regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA foram amplificadas com sucesso com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. A técnica de amplificação da região ITS com os *primers* universais LS266 e V9D produziu fragmentos entre 650 a 1000 pares de bases (FIGURAS 5 e 6).

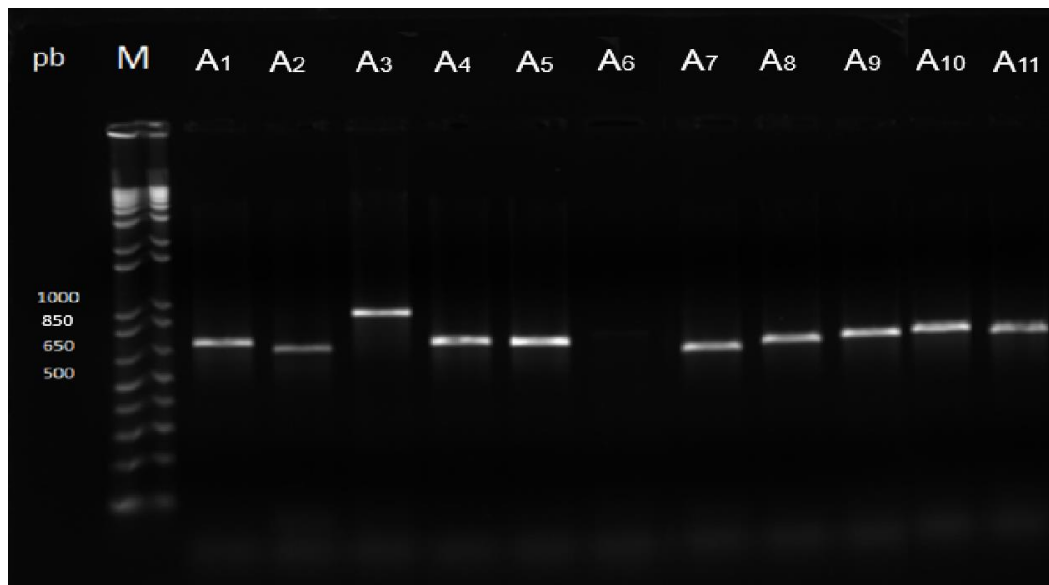


FIGURA 5 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,2% DOS FRAGMENTOS GERADOS PELA PCR COM OS *PRIMERS* V9D E LS266 DE 11 FUNGOS Pb - pares de bases, M - marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder Invitrogen, A1 ao A11 - amostras.  
 FONTE: O autor (2015)

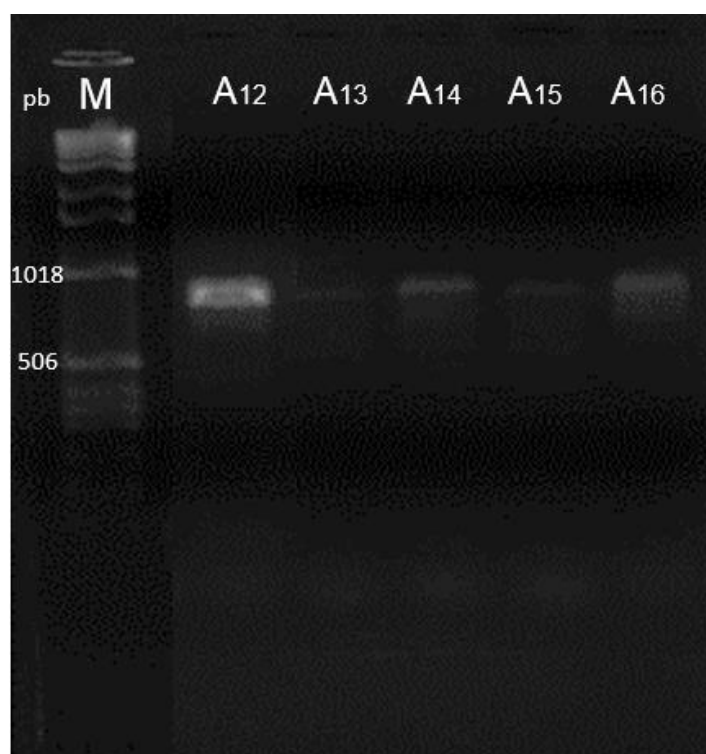


FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,2% DOS FRAGMENTOS GERADOS PELA PCR COM OS *PRIMERS* V9D E LS266 DE 05 FUNGOS Pb - pares de bases, M - marcador molecular 1 Kb DNA Ladder Invitrogen, A12 ao A16 - amostras.  
 FONTE: O autor (2015)

## 7.4 Sequenciamento do DNA fúngico

O sequenciamento automático dos fungos e leveduras apresentou os resultados presentes no Quadro 1.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Sequenciamento</b>	<b>Similaridade</b>
A1	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%
A2	Filamentoso	<i>Sarocladium glaucum</i>	99%
A3	Filamentoso	<i>Xerula pudens</i>	95%
A4	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100%
A5	Filamentoso	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	99%
A6	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97%
A7	Filamentoso	<i>Nigrospora oryzae</i>	99%
A8	Leveduriforme	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	99%
A9	Filamentoso	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98%
A10	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	97%
A11	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%
A12	Filamentoso	<i>Ganoderma lucidum</i>	92%
A13	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100%
A14	Filamentoso	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%
A15	Leveduriforme	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%
A16	Filamentoso	<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	99%

QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS  
FONTE: O autor (2015)

## 8. DISCUSSÃO

A comparação da microbiota do couro cabeludo das crianças não acometidas pela pediculose em relação às crianças acometidas não foi possível devido à baixa amostragem, além do fato de as crianças não estarem parasitadas pelo *P. humanus capitis*, tornando assim inviável a comparação. Entretanto, para estudos futuros uma maior amostragem será utilizada, composta de voluntários parasitados e não parasitados.

Os meios de cultura utilizados se mostraram eficientes para o crescimento da microbiota fúngica do couro cabeludo. Dentre os meios de transporte, o meio de Stuart apresentou-se mais viável que o meio Sabouraud. Apesar de os dois

meios de transporte mostrarem uma taxa de crescimento de microrganismos semelhante, o meio de Stuart, por ser um meio comercial, apresenta maior facilidade no manuseio e um menor risco de contaminação, sendo assim estabelecido como meio de escolha para o transporte. Quanto aos meios de isolamento, houve maior crescimento de fungos no meio SBA com tetracilina, que foi escolhido para ser utilizado no protocolo padrão. Foi observado também um grande crescimento bacteriano neste meio, mesmo com a utilização do antimicrobiano tetraciclina. Este fato pode ser explicado pela baixa concentração utilizada e também pelo espectro de ação reduzido do antimicrobiano, já que a tetraciclina atua somente na inibição do crescimento de bactérias gram negativas. A concentração de tetraciclina que será utilizada no protocolo padrão será de 10 mg/L no meio SBA. Outra alternativa de antibiótico que poderia ser utilizada é a adição de cloranfenicol ao ágar SBA, já que este antibiótico inibe o crescimento tanto de bactérias gram negativas quanto gram positivas, podendo assim reduzir o crescimento no SBA de colônias que não sejam de fungos.

A utilização dos ágar SBA e Extrato de Malte se mostrou uma adequada opção para o estoque dos fungos filamentosos, já que todos os fungos estocados apresentaram crescimento após repicados em meio de cultura BDA. O mesmo pode-se concluir para o estoque de leveduras em meio SBA coberto com óleo mineral.

A técnica do microcultivo de fungos filamentosos não se mostrou eficiente, já que a grande maioria dos fungos não apresentou esporulação e os fungos que apresentaram a formação de estruturas diferenciadas não puderam ser identificados por morfologia. Assim, esta técnica não será incluída no protocolo padrão.

Os protocolos utilizados para a realização das PCRs mostraram-se corretos, já que todas as reações de amplificação, inclusive as reações de sequenciamento, foram realizadas com sucesso.

O sequenciamento mostrou alguns resultados inesperados, não condizentes com o encontrado na literatura. A maioria dos fungos filamentosos identificados são fungos fitopatogênicos ou isolados do ambiente em matéria orgânica, como é o caso de *Sarocladium glaucum*, *Nigrospora oryzae*, *Leptosphaerulina chartarum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, além dos basidiomicetos *Xerula pudens* e *Ganoderma lucidum*.

O fungo *S. glaucum* é um ascomiceto pertencente à ordem Hypocreales. Há registros de estirpes isoladas de bambu e troncos mortos, pecíolo de planta morta e do ar sobre plantação de cana-de-açúcar (GLOBAL CATALOGUE OF MICROORGANISMS, 2015).

*N. oryzae* é um fitopatógeno pertencente à família Trichosphaeriaceae conhecido pela sua capacidade de colonização endofítica e patogênica em plantas como arroz e milho (MEW & GONZALES, 2002; SAUNDERS & KOHN, 2008).

*L. chartarum* pertence à família Dematiaceae (Deuteromycota). Este fungo vive em material vegetal morto, é cosmopolita e considerado saprófito em vegetais. Foi descrito pela primeira vez como isolado de folhas mortas e em hastes de plantas em países de clima temperado e sub-tropical, como Filipinas, Malásia, Austrália, entre outros (DINGLEY, 1962; HUGHES, 1953; ELLIS, 1960).

*C. gloeosporioides* é um fungo fitopatogênico, causador da antracnose em frutas pós-colheita, pertencente à família Glomerellaceae, filo Ascomycota (KIRK *et al.*, 2001). O fungo sobrevive em pecíolos e folhas velhas, de onde se disseminam através dos ventos e das chuvas para as flores e frutos novos (TAVARES, 2004).

*X. pudens* pertence à família Physalacriaceae, filo Basidiomycota. É um cogumelo que pode ser encontrado em solo de florestas de árvores de folhas largas (BIORESOURCE COLLECTION AND RESEARCH CENTER (BCRC): FUNGI COLLECTION IN BCRC, 2015; INDEX FUNGORUM PARTNERSHIP: INDEX FUNGORUM, 2015).

*G. lucidum* é um cogumelo medicinal presente na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos. É encontrado selvagem em solos de florestas nas regiões subtropicais do oriente. O cultivo artificial do fungo pode ser realizado em substratos como grãos, serragem e madeira (WASSER *et al.*, 2005; CHANG & BUSWELL, 1999).

Acredita-se que houve contaminação desde o isolamento dos fungos, o que pode ser devido ao fato de a estufa utilizada para crescimento dos fungos do couro cabeludo ser de uso compartilhado para crescimento também de fungos ambientais. Outra provável fonte de contaminação pode ter sido no momento da coleta da microbiota fúngica do couro cabeludo das crianças, que foi realizada pelos pais em suas próprias casas. Para tanto, para minimizar o

risco de contaminações, nos experimentos futuros sugere-se que as coletas sejam realizadas pelos integrantes do projeto, e não pelos pais e/ou responsáveis, devido à experiência que os pesquisadores possuem para coletar materiais biológicos, evitando assim, possíveis contaminações. Sugere-se também que os fungos devem ser incubados para crescimento em estufa de uso único para fungos isolados do couro cabeludo.

Quanto às leveduras, a presença de *Wickerhamomyces anomalus* em várias crianças sugere que esta pode ser uma levedura da microbiota normal do couro cabeludo. Esta levedura está amplamente dispersa no ambiente, podendo ser isolada de diversos habitats, como plantas, solo e animais (PASSOTH *et al.*, 2010). Estudos recentes também apontam *W. anomalus* como patógeno emergente, causador de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos (HAZEN, 1995). A ocorrência de leveduras do gênero *Rhodotorula* está de acordo com o descrito por Park *et al.*, em 2012, que mostra a participação deste gênero na composição da microbiota normal do couro cabeludo.

## **9. CONCLUSÃO**

A padronização de técnica para o isolamento e identificação da microbiota fúngica do couro cabeludo é um passo de suma importância, já que a partir dela se definem protocolos corretos para futuras análises. Alguns ajustes ainda precisam ser realizados no protocolo para o refinamento da técnica de isolamento e identificação de fungos do couro cabeludo e diminuição de falhas. Este trabalho foi primordial para direcionar estudos posteriores com o intuito de investigar se a microbiota fúngica tem relação com a predisposição que determinadas crianças tem à pediculose, uma vez que há indícios de que fungos produzem compostos voláteis que estão intimamente ligados à atratividade de determinados insetos.

## REFERÊNCIAS

ACREE, F.; TURNER, R.B.; GOUCK, H.K.; BEROZA, M.; SMITH, N. L-lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. **Science**, v. 161, p. 1346-1347, 1968.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p.3389-3402, 1997.

BARBOSA, J. V; PINTO, Z. T. Pediculose no Brasil. **Entomol. Vect.**, v. 4, n. 10, p. 579-586, 2003.

BIORESOURCE COLLECTION AND RESEARCH CENTER (BCRC): FUNGI COLLECTION IN BCRC. Disponível em:  
<[http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal\\_detail.jsp?id=FU200802120069](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802120069)>  
Acesso em 05/07/2015.

BOWEN, M.F. The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. **Ann. Rev. Entomol**, v. 36, p. 139–158, 1991.

BRAKS, M.A.H.; TAKKEN, W. Incubated human sweat but not fresh sweat attracts the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 663–672, 1999.

BURKHART, C.N.; ARBOGAST, J., SMYTHE, P.; BURKHART, C.G. Histochemical analysis of the nit of *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of medical entomology**, v. 36, p. 530-532, 1999.

CATALA, S.; CARRIZO, L.; CORDOBA, M.; KHAIRALLAH, R.; MOSCHELLA, F.; BOCCA, J.N.; CALVO, A.N.; TORRES, J.; TUTINO, R. Prevalence and parasitism intensity by *Pediculus humanus capitis* in six to eleven-year-old schoolchildren. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 499-501, 2004.

CATALA, S.; JUNCO, L.; VAPORAKY, R. Pediculus capitis infestation according to sex and social factors in Argentina. **Revista de Saúde Pública** v. 39, p. 438-443, 2005.

CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphylophoromycetidae): A mushrooming medicinal mushroom. **Int J Med Mushrooms** v.1, p.139–146, 1999.

CHOSIDOW, O. Scabies and pediculosis. **Lancet**, v. 355, p. 819-826, 2000.

DINGLEY, J.M. *Pithomyces chartarum*, its occurrence, morphology and taxonomy. **N. Z. J. Agric. Res.**, v.5, p.49-61, 1962.

DURDEN, L.A.; MUSSER, G.G. The sucking lice (Insecta: Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. **Bull Am Mus Nat Hist**, v. 218, p. 1–90, 1994.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes I. **Ibid.** v. 76, p. 1-36, 1960.

FINDLEY, K.; OH, J.; YANG, J.; CONLAN, S.; DEMING, C.; MEYER, J.A.; SCHOENFELD, D.; NOMICOS, E.; PARK, M.; PROGRAM NIHISCCS, KONG, H.H.; SEGRE, J.A. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. **Nature**, v. 498, p. 367-370, 2013.

GLOBAL CATALOGUE OF MICROORGANISMS. Disponível em:  
<[http://gcm.wfcc.info/NameListDisplayInServlet?name=Sarcocladium%20glaucom&displayin=table&strain\\_number=&advanced=null&namelist\\_collection=&namelist\\_temperature=&namelist\\_organismtype=&namelist\\_isolatedfrom=](http://gcm.wfcc.info/NameListDisplayInServlet?name=Sarcocladium%20glaucom&displayin=table&strain_number=&advanced=null&namelist_collection=&namelist_temperature=&namelist_organismtype=&namelist_isolatedfrom=)>. Acesso em: 05/07/2105.

GULGUN, M.; BALCI, E.; KARAOĞLU, A.; BABACAN, O.; TÜRKER, T. Pediculosis capitis: prevalence and its associated factors in primary school children living in rural and urban areas in Kayseri, Turkey. **Cent Eur J Public Health** v. 21(2), p. 104-108, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Ser.** v. 41, p. 95-98, 1999.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev** v. 8, p.462–478, 1995.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol** v. 66, p. 411-453, 1991.

HUGHES, S. Fungi from the Gold Coast II. **Mycol. Pap.** v.50, p.104, 1953.

INDEX FUNGORUM PARTNERSHIP: INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.gbif.org/species/110181677>> Acesso em: 05/07/2015.

KIRK, P. M.; CANON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the fungi.** ed. Wallingford: CABI Bioscience, p. 655, 2001.

KNOLS, B.G.; MEIJERINK, J. Odors influence mosquito behavior. **Science and Medicine**, p. 56-63, 1997.

KNOLS, B.G.J. Odour-mediated hostseeking behaviour of the Afro-tropical malaria vector *Anopheles gambiae* Giles. **PhD thesis.** Wageningen Agric. Univ., The Netherlands, p. 213. 1996.

KNOLS, B.G.J.; DE JONG, R.; TAKKEN, W. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, p. 604–606, 1995.

KNOLS, B.G.J.; DE JONG, R.; TAKKEN, W. Trapping system for testing olfactory responses of the malarial mosquito *Anopheles gambiae* in a wind tunnel. **Med Vet Entomol**, v. 8, p. 386-388, 1995.

LINARDI P, MARCONDES C. Piolhos (sugadores e mastigadores). **Entomologia médica e veterinária.** São Paulo: Atheneu, p. 183-238, 2001.

LINARDI, P. M. Anoplura. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Atheneu, 2002, p. 368-372.

LUPATINI, M.; MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z.I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de Eucalyptus grandis W. Hill ex- maiden. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, vol. 32, p. 2677-2682, 2008.

MADUREIRA, P.R. Aspectos Epidemiológicos da Pediculosis Capitis. Estudos entre pré-escolares de Paulínia-SP. Universidade Estadual de Campinas, 1992.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biотecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul, 2002. p. 433.

MBOERA, L.E.; TAKKEN, W.; SAMBU, E.Z. The response of Culex quinquefasciatus (Diptera: culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania. **Bull Entomol Res**, v. 90, p. 155–159, 2000.

MEW, T. W.; P. GONZALES. Handbook of Rice Seedborne Fungi. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute (IRRI) and Enfield, NH: **Science Publishers**, p. 83, 2002.

MUMCUOGLU, K.; FRIGER, M.; IOFFE-USPENSKY, I.; BEN-ISHAI, F; MILLER, J. Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of Head Louse Infestations. **Pediatric Dermatology**, v. 18, p. 9-12, 2001.

PARK, H.K.; HA, M.H.; PARK, S. G.; KIM, M.N, KIM, B.J.; et al. Characterization of the Fungal Microbiota (Mycobiome) in Healthy and Dandruff-Afflicted Human Scalps. **PLoS one** v.7, e32847, 2012.

PASSOTH, V.; OLSTORPE, M.; SCHNURER, J. Past, present and future research direction with *Pichia anomala*. **Journal of Microbiology** v. 99, p. 121–125, 2010.

RENNIE, P.J.; GOWER, D.B.; HOLLAND, K.T. In-vitro and in-vivo studies of human axillary odor and the cutaneous microflora. **British Journal of Dermatology**, v. 124, p.596–602, 1991.

RHODES, M. E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118, 1957.

ROBINSON, D.; LEO, N.; PROCIV, P.; BARKER, S.C. Potencial role of head lice, *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii*. **Parasitology Research**, v. 90, p. 209-211, 2003.

SAUNDERS, M.; L. M. KOHN. Host-synthesized secondary compound influence the in vitro interactions between fungal endophytes of Maize. **Appl. Environ. Microbiol** v. 74, p. 136–142, 2008.

SMALLEGANGE, R. C.; VERHULST, N. O.; TAKKEN, W. Sweaty skin: an invitation to bite? **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 143-148, 2011.

STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 43, p. 303-322, 2001.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAKKEN, W. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: a review. **Insect Sci Appl**, v. 12, p. 287–295, 1991.

TAKKEN, W.; KNOLS, B.G.J. Odor-mediated behavior of afrotropical malária mosquitoes. **Annu Rev Entomol**, v. 44, p. 131–157, 1999.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2004.

TEBRUEGGE, M.; PANTAZIDOU, A.; CURTIS, N. What's bugging you? An update on the treatment of head lice infestation. **Archives of disease in childhood. Education and practice edition**, v. 96, p. 2-8, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VAN DEN ENDE, A. H. G., & G. S. DE HOOG. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Stud. Mycol**, v. 43, p. 151-162, 1999.

VERHULST, N.O.; ANDRIESSEN, R.; GROENHAGEN, U.; BUKOVINSZKINE, K.G.; SCHULZ, S.; TAKKEN, W.; VAN LOON, J.J.; SCHRAA, G. SMALLEGANGE, R.C. Differential attraction of malaria mosquitoes to volatile blends produced by human skin bacteria. **PloS one**, v. 5, e15829, 2010.

VERHULST, N.O.; QIU, Y.T.; BEIJLEVELD, H.; MALIEPAARD, C.; KNIGHTS, D.; SCHULZ, S.; BERG-LYONS, D.; LAUBER, C.L.; VERDUIJN, W.; HAASNOOT, G.W.; MUMM, R.; BOUWMEESTER, H.J.; CLAAS, F.H.; DICKE, M.; VAN LOON, J.J.; TAKKEN, W.; KNIGHT, R.; SMALLEGANGE, R.C. Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. **PloS one**, v. 6, e28991, 2011.

WASSER, S.P.; COATES, P.; BLACKMAN, M.; CRAGG, G.; LEVINE, M.; MOSS, J.; WHITE, J. **Encyclopedia of Dietary Supplements**. New York: Marcel Dekker; Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) pp. 680–90, 2005

WEISS, R.A. Apes, lice and prehistory. **Journal of biology** v. 8, p. 20, 2009.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, p.315-322, 1990.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Questionário sobre pediculose aplicado aos pais das crianças



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Patologia Básica



O projeto intitulado “Diferentes aspectos de susceptibilidade à pediculose no Brasil” tem por objetivo investigar porquê algumas crianças são mais infestadas por piolhos que outras, para tanto, pretende-se estudar se a microbiota do couro cabeludo (fungos e/ ou bactérias) pode influenciar na predisposição à pediculose. Para que esta pesquisa seja realizada é necessária a seleção de crianças para a coleta de material (fricção de um swab no couro cabeludo) para participarem do *projeto piloto*. Estamos convidando as crianças de sua família para participarem desta fase do projeto e a seleção será baseada em características que atendam às questões abaixo relacionadas.

1. Nome do entrevistado (a): \_\_\_\_\_
2. Nome da criança: \_\_\_\_\_
3. Escola que estuda: \_\_\_\_\_
4. Idade da criança: \_\_\_\_\_
5. A criança tem alguma doença dermatológica crônica? ( ) Sim ( ) Não
6. Tomou antibiótico e/ou antifúngico nos últimos seis meses? ( ) Sim ( ) Não
7. A criança:  
( ) Nunca teve piolhos no decorrer da sua vida.  
( ) Teve piolhos até duas vezes no decorrer da sua vida.  
( ) Teve piolhos mais de duas vezes no decorrer da sua vida.
8. A criança tem cabelo oleoso? ( ) Sim ( ) Não
9. O couro cabeludo apresenta umidade “suor” excessivo? ( ) Sim ( ) Não
10. Convive com pessoas infestadas por piolhos e não é parasitada? ( ) Sim ( ) Não
11. Caso a criança seja selecionada para participar do projeto piloto seria possível, no período de 24 horas que antecederão a coleta (que será dia 09 de março – Segunda-feira próxima):
  - Não lavar o cabelo e/ou utilizar creme de pentear ( ) Sim ( ) Não
  - Não utilizar produtos como perfumes, loções, cremes corporais ou sabonetes antibacterianos próximos da região occipital e retroauricular da cabeça ( ) Sim ( ) Não
  - Não ingerir alimentos como cebola, alho ou pimenta ( ) Sim ( ) Não

Obs. Caso a criança seja selecionada entraremos em contato e por isso solicitamos seu e-mail e ou telefone:

E-mail: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Obrigada,

Dra. Débora do Rocio Klisiowicz

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Patologia Básica  
C.P. 19031, 81.531-980, Curitiba, PR, Brasil  
Tel: +55 41 33611704 Fax +55 41 3266.2042  
e-mail: deborak@ufpr.br

## **ANEXO 2 – Composição dos meios de cultura utilizados**

### Ágar Sabouraud:

- Dextrose 40 g/L
- Peptona 10 g/L
- Ágar bacteriológico 15 g/L

### Ágar Batata Dextrose:

- Infusão de batata 200 g/L
- Dextrose 20 g/L
- Ágar bacteriológico 15 g/L

### Ágar Extrato de Malte:

- Extrato de malte 20 g/L
- Dextrose 20 g/L
- Peptona 1 g/L
- Ágar bacteriológico 15 g/L

## **ANEXO 3 – Coloração de Gram**

- Cristal Violeta por 1 minuto
- Lavagem com água destilada
- Lugol por 1 minuto
- Álcool 96° até descorar
- Lavagem com água destilada
- Fucsina por 30 segundos
- Lavagem com água destilada